

DOI:10.11931/guihaia.gxzw201810021

渗透剂对白刺花体细胞胚成熟及萌发的影响

吴丽芳, 魏晓梅

(曲靖师范学院, 生物资源与食品工程学院, 云南高原生物资源保护与利用研究中心,
云南 曲靖 655011)

摘要: 为探讨不同渗透剂对白刺花体细胞胚成熟及萌发的影响, 该文以蔗糖、麦芽糖、山梨醇及 PEG (6000) 作为渗透剂, 研究对白刺花体细胞胚发育、成熟和萌发的影响。结果显示: 白刺花下胚轴形成的胚性愈伤组织接种至 MS + 2, 4-D $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 蔗糖 $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 谷氨酰胺 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 植物凝胶 $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上, 体细胞胚发生率高达 66.21%, 总胚数为 79 个; 7%蔗糖可使体细胞胚成熟率高达 64.36%, 同时也提高了多子叶畸形胚形成; 2%麦芽糖+2%山梨醇+4%蔗糖组合使体细胞胚成熟率最高达 88.89%, 畸形胚比例最低; 30 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PEG 培养时, 体细胞成熟率最高, 为 82.35%; 鱼雷期的体细胞胚最适转接, 可使体胚萌发率达 90.58%, 复合糖上培养得到的成熟体细胞胚生根率最高, 为 87.47%。研究结果可为实现白刺花体细胞胚育苗奠定理论基础和提供可行的方案。

关键词: 白刺花, 渗透剂, 体细胞胚, 体细胞胚成熟, 体细胞胚萌发

Effects of penetrant on maturation and germination for somatic embryo of *Sophora davidii*

WU Lifang, WEI Xiaomei

(Center for Yunnan Plateau Biological Resources Protection and Utilization, College of
Biological Resource and Food Engineering, Qujing Normal University, Qujing
655011, Yunnan, China)

Abstract: TO discuss the effect of different penetrant on maturation and germination of somatic embryo of *Sophora davidii*. Sucrose, maltose, sorbitol and PEG (6000) were used as penetrant in this paper. The development, maturation, and germination of somatic embryo was determined by different penetrant comparison. The results showed that embryonic callus from hypocotyl of *Sophora davidii* were cultured on MS+ 2, 4-D $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + 6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + TDZ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + sucrose $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ + glutamine $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + plant gel $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, somatic embryogenesis rate is up to 66.21%, the total number of embryos was 79/g. 7% sucrose can promote the maturation rate of somatic embryos to 64.36%, meanwhile also increased the polycotyledonous abnormal embryos. Somatic embryo were cultured on 2% maltose + 2% sorbitol + 4% sucrose combination medium, maturation rate of somatic embryos was as high as 88.89%.

基金项目: 云南省教育厅项目(2014Y440); 曲靖师范学院教育教学改革项目(JGXM2016013, JGXM201812)。

[Supported by the Yunnan Education Department Program (2014Y440); Education Teaching Reform Program of Qujing Normal University (JGXM2016013, JGXM201812)]。

作者简介: 吴丽芳(1980-), 女, 云南省宣威人, 硕士, 副教授, 研究方向为植物资源的评价与利用, (E-mail)

wulifang0871@163.com。

and the proportion of abnormal embryos was the lowest. PEG concentration is $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, the maturation rate of somatic embryos was 82.35%. Torpedo embryo was transported culture, the rate of somatic embryo germination was up to 90.58%.The rooting rate of mature somatic embryos was high, for 87.47% from three sugar combination culture. This study provides a theoretical foundation and a feasible scheme for the development of somatic embryo seedling of *Sophora davidii*.

Key words : *Sophora davidii*, penetrant, somatic embryo, somatic embryo maturation, somatic embryo germination

植物组织培养中体细胞胚发生途径是获得再生植株有效方法之一,由于体细胞胚发生具有数量多、来源于单个的原始胚性细胞,遗传相对稳定,结构完整,再生率高可作为外源基因转化受体等优点(Gupta & Pullman, 1991),已成为遗传改良、人工种子生产的原材料、快速繁育和商品化生产种苗的前提(胡颂平和刘选明, 2014)。最早通过体细胞胚发生的报道来自 Steward(1958)和 Reinert(1959)对胡萝卜根的培养,随后在一些草本植物中相继培养获得成功,木本植物由于生长发育规律、器官部位等与草本植物有较大差异,使木本植物体细胞胚胎发生的种类很有限,在世界范围内,目前通过体细胞胚发生途径诱导并培育出再生植株的木本植物约 180 余种。国外对栎属(*Quercus* L.)、杨属(*Populus* L.)、挪威云杉(*P. abies*)、白云杉(*P. glauca*)、黑云杉(*P. mariana*)等研究较为深入全面,且花旗松(*Pseudotsuga menziesii*)、火炬松(*Pinus taeda*)、辐射松(*Pinus radiata*)、挪威云杉(*Picea abies*)、水曲柳(*Fraxinus mandshurica*)、杂交鹅掌楸(*Liriodendron hybrids*)等体细胞胚的诱导和再生植株已成功应用于生产实践,进行商业化的苗木生产。按树(*Eucalyptus camakdulensis*)、北美鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera*)、欧洲落叶松(*L.decidua*)等利用其体细胞胚发生体系,实现了抗病虫、抗逆等基因转移(陈金慧等, 2003)。然而截止目前,白刺花(*Sophora davidii*)有关方面的研究尚属空白。

白刺花(*Sophora davidii*)为豆科槐属落叶灌木,在西南喀斯特地区和北方干旱地区常作水土保持的先锋树种(李芳兰等, 2009)、(何晓, 2007)、(何建利等, 2018)。白刺花根、茎、叶、花、和种子均可入药,具有清热利咽、消热解暑和凉血消肿等药用功效(毛晓健等, 2009)。小花数多、密集,是春天优良的蜜源植物和天然无公害“绿色食品”(樊建, 2005)。在白刺花的开发利用中调查发现,白刺花虽开花数多,结实量大,但由于种子硬实(吴丽芳等, 2014),种皮透水透气性差具有休眠性(吴丽芳等, 2018),自然状态下幼苗少,种群更新慢,限制幼苗生长及定居,若能通过体细胞胚发生途径形成再生植株无疑是解决有性繁殖种苗慢有效途径之一。然而,通过前期对白刺花研究发现,体细胞胚诱导中存在诱导率低,萌发率低等问题,因此该文在前期基础上,以优化白刺花体细胞胚培养条件,提高体胚的成熟和萌发,研究影响体胚分化中生长素和细胞分裂素浓度配比,筛选适宜的培养条件,针对体胚萌发率低的问题,通过调节培养基中的渗透压和培养基内的组成成分来确定萌发过程中所需要的营养物质和关键因素,以期为实现白刺花体细胞胚育苗奠定理论基础和提供可行的方案。

1 材料与方法

1.1 试验材料

在前期研究基础上,以白刺花下胚轴在 MS+2,4-D $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +TDZ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +6-BA $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +谷氨酰胺 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养基上诱导的胚性愈伤组织作为供试材料。

1.2 白刺花体细胞胚的诱导

将胚性愈伤组织转接至 MS + 2, 4-D $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +6-BA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + TDZ $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +谷氨酰胺 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +植物凝胶 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的体细胞胚分化培养基上, pH5.8, $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光下培养, 光照 $14\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 温度 25°C 。培养 40d 后, 统计体细胞胚发生率及不同培养基上每克鲜重愈伤组织的体细胞胚总数和不同发育期的体细胞胚数。

体细胞胚发生率(%)=产生体细胞胚的愈伤组织数/接种胚性愈伤组织的外植体数 $\times 100\%$;

体细胞胚数(每克愈伤组织形成的体细胞胚数,个 $\cdot\text{g}^{-1}$)=体细胞胚个数 / 愈伤组织鲜质量。

1.3 白刺花体细胞胚成熟培养

将白刺花体细胞胚分化培养得到的球形胚接种于体细胞胚成熟培养基上, 成熟培养基比较蔗糖 (2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%), 麦芽糖 (2%, 5%, 7%) +蔗糖 4%, 山梨醇 (2%, 5%, 7%) +蔗糖 4%, 麦芽糖 2%+山梨醇 2%+蔗糖 4%, PEG6000(20, 30, 40, 50, 60, 70 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), ABA $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, NAA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 6-BA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, TDZ $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 谷氨酰胺 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 植物凝胶 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 活性炭 $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 不同组合培养上每处理接种 10 瓶, 每瓶接种 4-6 个体胚, $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 的光下培养, 光照 $14\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 温度 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 培养 45d 后, 观察不同成熟培养的体胚生长发育情况, 记录体胚成熟数目。

1.4 白刺花体细胞胚的萌发

将上述 1.2 培养中得到的不同发育期体细胞胚分别接种于体胚萌发培养基上, 萌发培养基为 1/3MS, 麦芽糖 2%+山梨醇 2%+蔗糖 4%, $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭, $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 植物凝胶, pH5.8。 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光下培养 50d 后, 观察体胚的萌发状况, 统计发育正常的幼苗数, 计算体胚萌发率, 测定体细胞胚成苗质量。

体细胞胚萌发率(%)=萌发成幼苗的体胚/接种的体胚 $\times 100\%$;

体细胞胚成苗质量 (mg)=体细胞胚成苗鲜重-接种时体胚鲜重

1.5 白刺花生根培养与植株再生

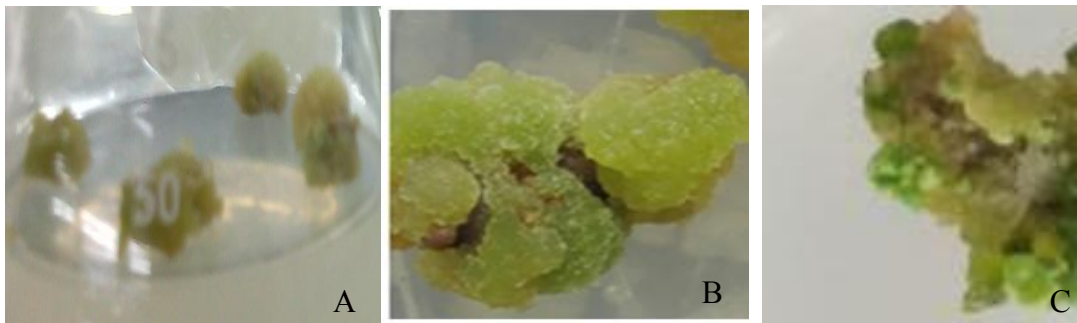
不同渗透剂培养得到的成熟体细胞胚转入生根培养基进一步培养, 生根培养基为 1/2MS+NAA $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ + $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 活性炭+蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +琼脂 $7\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 直至获得完整植株, 最后将幼苗炼苗后移栽至装有基质(腐殖土:珍珠岩: = 2:1)的花盆中, 30 d 后统计植株成活率。

植株成活率(%)=移栽成活的植株(株)/移栽的总株数(株) $\times 100\%$

2 结果与分析

2.1 白刺花体细胞胚的诱导

胚性愈伤组织接种至 MS + 2, 4-D $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +6-BA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +TDZ $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ +谷氨酰胺 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +植物凝胶 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养基后, 前 10 d 内可见胚性愈伤组生长, 表面松软, 稍颗粒状(图 1: A), 随着培养时间的增长, 愈伤表面淡黄色, 光滑突起, 约 30 d 左右突起圆柱状纵向伸长(图 1: B), 有幼小的体胚开始发育而成(图 1: C)。培养 40 d 后, 可以得到高频发生的白刺花体细胞胚, 包括球形胚、心形胚、鱼雷形和少部分子叶胚。经统计, 体细胞胚发生率为 66.21%, 每克愈伤组织上获得的总胚数为 79 个, 其中球形胚有 52 个, 心形胚有 18 个, 鱼雷胚为 8 个, 子叶胚有 4 个。形成的子叶胚中, 一个仅有 1 片子叶, 1 个有多个子叶, 另外两个形态正常。



注：A. 培养 10d 的胚性愈伤组织； B. 培养 30d 的胚性愈伤组织； C. 有体细胞胚发生的愈伤组织。
Note: A. Culture 10 days for embryonic callus; B. Culture 30 days for embryonic callus;
C. Somatic embryogenesis from outer embryonic callus.

图 1 胚性愈伤组织的生长
Fig. 1 Growth of embryonic callus

2. 2 渗透剂对白刺花体细胞胚成熟的影响
2.2.1 蔗糖对白刺花体细胞胚成熟的影响

蔗糖在植物离体培养时既可以提供能源，同时也起着调节渗透压的作用，试验中以 4% 的蔗糖作为对照。从表 1 可以看出，随着蔗糖浓度的增加，体细胞胚越趋于成熟，蔗糖浓度 7%，体细胞胚成熟率最高，为 64. 36%；蔗糖浓度为 2%时，体细胞胚成熟率最低，仅 35. 58%；从试验也观察到低浓度的蔗糖和高浓度的蔗糖都不利于正常体细胞胚的育，低浓度时，体细胞胚长势差，出现透明水渍状的玻璃胚，生活力弱，逐渐变褐死亡，高浓度蔗糖时，多子叶畸形胚形成，且有簇生的类似单子叶胚拥有共同胚轴的体胚形成，此类体细胞胚不能进一步发育。相对适合的蔗糖浓度为 5%~6%，体胚粗壮膨大，下胚轴伸长。

表 1 蔗糖对白刺花体细胞胚成熟的影响

Table1 Effects of sucrose concentration on somatic embryos maturation of <i>Sophora davidii</i>		
蔗糖浓度（%） Sucrose concentration	体胚成熟率(%) Somatic embryos maturation rate	体细胞胚发育观察 Somatic embryos development
2	35.58±2.70a	形成的体胚淡黄偏白，长势差，水渍状稍透明，易褐化死亡 Somatic embryos are pale yellow to white, poor growth, Water stains slightly transparent, Browning easily and dies.
3	41.84±0.96b	形成的体胚偏白，有胚轴伸长，部分体胚类似玻璃化 The somatic embryo is white, hypocotyl elongation, some somatic embryo vitrification
4	50.00±1.79c	体胚淡黄稍白，体胚增大，胚轴稍粗，有单子叶胚，多子叶胚和正常双子叶胚 Somatic embryos are pale yellow to white, enlargement, thick hypocotyl, there are monocotyledonous, polycotyledonous and normal dicotyledonous embryos.
5	54.21±2.38c	体胚淡黄稍白，体胚增大，胚轴稍粗，双子叶胚 Somatic embryos are pale yellow to white, enlargement,

6	58.16±1.09cd	thick hypocotyl, dicotyledonous embryos. 体胚淡黄稍白，体胚增大，胚轴稍粗，双子叶胚 Somatic embryos are pale yellow to white, enlargement, thick hypocotyl, dicotyledonous embryos.
7	64.36±4.16e	体胚淡黄稍白，胚轴粗壮伸长，多子叶畸形胚形成 Somatic embryos are pale yellow to white, hypocotyl is stout and elongated, polycotyledonous abnormal embryos.

注：小写字母为 $P<0.05$ 的显著性差异分析。
Note: Different lowercase letters resperesented significant difference ($P<0.05$)。

2. 2. 2 复合糖对白刺花体细胞胚成熟的影响

麦芽糖、蔗糖和山梨醇不同组合对白刺花体细胞胚成熟的影响结果见表 2，不同浓度的麦芽糖与蔗糖组合中，体细胞胚成熟率随着麦芽糖浓度的增加而，当麦芽糖浓度为 7%时，体细胞胚成熟率最高，达 86. 27%，相应的畸形胚发生率也最高，为 22. 73%，麦芽糖浓度为 2%时，体胚成熟率为 57. 41%，畸形胚占总成熟胚的比例为 22. 58%，而麦芽糖浓度为 5%时，畸形胚比例最低，仅 10. 81%。山梨醇与蔗糖的组合中，成熟体细胞胚胎数也是随山梨醇浓度的增加而增加，2%的山梨醇与蔗糖组合时，体细胞胚成熟率最低，仅 51. 79%，7%的蔗糖时，体细胞胚成熟率最高，为 78. 18%，畸形胚比例为 18. 60%，而山梨醇为中等浓度 5%，体细胞胚成熟率为 71. 93%，畸形体胚率最低，为 9. 76%。2%麦芽糖与 2%山梨醇和 4%蔗糖组合中，得到的体细胞胚成熟率最高，为 88.89%，畸形胚比例最低，仅 6.25%。说明糖源的种类及浓度对体细胞胚成熟率和畸形胚的比例有影响。

表 2 复合糖对白刺花体细胞胚成熟的影响

Table2 Effects of different sugar combination on somatic embryos maturation of *Sophora davidii*

糖类组合 (%) Different sugar combination	接种数 Number of globular embryo	成熟体胚数 Number of somatic embryos	体胚成熟率(%) Somatic embryos maturation rate	畸形体胚数 Number of abnormal somatic embryos
2%麦芽糖+4%蔗糖 2% maltose+4% sucrose	54	31	57.41±1.83f	7
5%麦芽糖+4%蔗糖 5% maltose+4% sucrose	53	37	69.81±0.92de	4
7%麦芽糖+4%蔗糖 7% maltose+4% sucrose	51	44	86.27±2.55ab	10
2%山梨醇+4%蔗糖 2%sorbitol+4% sucrose	56	29	51.79±1.79g	5
5%山梨醇+4%蔗糖 5%sorbitol+4% sucrose	57	41	71.95±1.75d	4
7%山梨醇+4%蔗糖 7%sorbitol+4% sucrose	55	43	78.18±0.53c	8
2%麦芽糖+2%山梨 醇+4%蔗糖 2% maltose+2% sorbitol +4% sucrose	54	48	88.89±1.71a	3

2.3 PEG 对白刺花体细胞胚成熟的影响

PEG 作为渗透剂通常能引起水分胁迫，使细胞内蛋白质的合成受抑，细胞分别受阻，加速体细胞胚的发育。表 3 为不同浓度 PEG 对白刺花体细胞胚成熟的试验结果，由表可知，PEG 浓度为 30 g·L⁻¹，体细胞成熟率最高，达 82.35%，畸形胚比例仅 9.52%。而 PEG 浓度超过 30 g·L⁻¹，体细胞胚成熟率开始下降，当 PEG 浓度为 70 g·L⁻¹，体细胞胚成熟率仅 41.51%，畸形胚比例高达 31.82%。

表 3 PEG 对白刺花体细胞胚成熟的影响

Table3 Effects of PEG on somatic embryos maturation of *Sophora davidii*

PEG 浓度 g·L ⁻¹ PEG concentration	接种数 Number of globular embryo	成熟体胚数 Number of somatic embryos	体胚成熟率(%) Somatic embryos maturation rate	畸形体胚数 Number of abnormal somatic embryos
0	54	27	50.00±1.79f	4
20	49	29	59.18±0.78d	6
30	51	42	82.35±0.99a	4
40	52	39	75.00±1.65b	5
50	50	33	66.00±2.65c	5
60	54	30	55.56±2.11e	5
70	53	22	41.51±1.07g	7

2.4 白刺花体细胞胚的萌发

过渡期得到的不同发育期的体细胞胚接种于不含任何激素的体胚萌发培养基上，其体细胞胚萌发能力不一致，球形胚接种后需经心形期，鱼雷期和子叶期，再形成子叶胚直至发育出幼苗，约 40 d 左右，成苗时间长，形成的幼苗长势稍弱；心形胚培养时，其发育仍先发育成鱼雷胚再经历子叶胚；子叶胚培养时，部分体胚颜色会变成米白色呈衰老状态最终褐化而死；而鱼雷胚转接时，10 d 后转变为子叶胚，子叶逐渐展开，随后颜色变为绿色，胚轴伸长，基部主根开始生长，约 20 d 左右，可见小幼苗长成，成苗时间快，进行苗少，形成的幼苗长势健壮。不同的体细胞胚其萌发能力见表 4，鱼雷期的体胚萌发能最高，为 90.58%，成苗质量 103 mg/棵，而球形期的体胚萌发率最低，仅 69.77%，成苗质量 81 mg/棵。

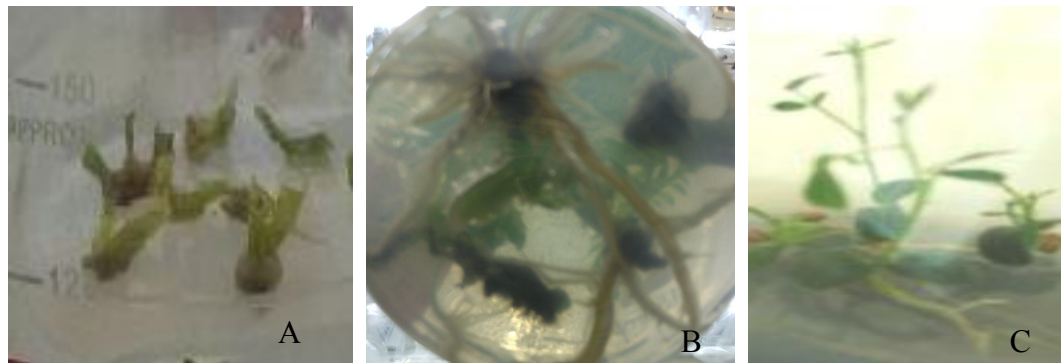
表 4 不同发育期体细胞胚萌发能力的比较

Table 3 Comparison of germination ability of somatic embryos in different stage

体胚类型 Somatic embryos type	接种数 Number of somatic embryos	成苗数 Plantlet number	体细胞胚萌发率(%) Germination rate	成苗质量 (mg/棵) Seedlings weight
球形胚 Globular embryo	86	60	69.77±3.59a	81
心形胚 Heart-shaped embryo	79	57	72.15±1.10a	87
鱼雷胚 Torpedo embryo	85	77	90.58±4.32b	103
子叶胚 Cotyledon embryo	83	61	73.49±0.94 a	89

2.5 白刺花生根培养与植株再生

不同渗透剂培养得到的成熟体细胞胚转入生根培养基培养(图 2: A), 麦芽糖+山梨醇+蔗糖组合培养基的成熟体细胞胚生根率最高, 为 87.47%, 除主根长出外, 有些小苗还有 5~6 根侧根, 且下胚轴健壮、根粗壮, 子叶舒展(图 2: B); 仅蔗糖的培养基上, 生根率不如复合糖上的培养, 生根率为 77.51%; 而在 PEG 的培养基上培养的体细胞胚, 生根率介于两者之间, 为 82.13%。将得到的幼苗(图 2: C)培养室打开瓶塞炼苗 7 d 后, 移栽至温室花盆中, 前 20 d 内保持湿度 80%以上, 避免强烈阳光直射, 30 d 后幼苗移栽成活率达 92%以上。



注: A. 成熟体细胞胚生根培养; B. 体胚苗生根; C. 再生植株。

Note: A. Rooting culture of mature somatic embryos; B. Rooting of buds; C. Regeneration plant.

图 2 成熟体细胞胚的生根

Fig.2 Rooting of mature somatic embryos

3 讨论

植物组织培养中添加的糖类有蔗糖、葡萄糖、果糖、麦芽糖、甘露醇、山梨醇等。糖类除为细胞提供 C、H、O、N 等必要元素外, 还起到调节渗透压的作用。蔗糖是植物培养时使用经常使用的糖类, 一般使用浓度为 2%~5%, 特殊培养如花药或幼胚培养时需较高的蔗糖浓度, 因对体细胞胚的发育起到重要作用。细胞培养和原生质体培养时, 为了使培养物生长良好, 出蔗糖外, 还需配合其它糖类。许建秀等(2017)在抗松材线虫病赤松体细胞胚的发育和成熟萌发研究中使用麦芽糖与蔗糖对比, 得出 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦芽糖比蔗糖更适宜抗病赤松的体细胞胚发育和成熟。齐力旺等(2004)对华北落叶松的研究表明, 3%麦芽糖与 4%的 PEG(4000)的组合比蔗糖与 PEG(4000)组合的效果好, 且体细胞胚成熟频率高, 植株生根率达 57.89%, 体细胞胚质量大大优于蔗糖和 PEG4000 组合。顾晓川等(2018)对橡胶的研究中发现蔗糖添加量不影响胚状体的再生率, 蔗糖添加量对橡胶树胚状体植株再生的株高和抽叶影响比较大。该文中, 不同糖类及糖类组合均影响体细胞胚的成熟。单一使用蔗糖浓度为 5%~6%, 形成的体细胞胚粗壮膨大, 下胚轴伸长。而过高的蔗糖浓度, 虽可提高白刺花体细胞胚成熟率, 但会增加畸形胚的比例。

PEG 作为渗透调节剂促进体细胞胚成熟早有报道, 其原理是引起细胞失水, 使细胞内含物的浓度相应提高, 促进体胚的成熟及萌发。孙桂君(2009)对水曲柳体细胞胚成熟及萌发的研究中, 添加 $70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PEG 对水曲柳的体胚成熟有明显的促进作用。该文研究认为, 适度的 PEG 可促进体细胞胚的成熟, 但过高浓度的 PEG 反而会使体细胞胚成熟率降低和增加畸形胚比例。分析原因可能适当 PEG 透压引起水分胁迫, 能够使细胞内正常的蛋白质合成受阻, 而相应地诱导一些胁迫蛋白质合成, 达到调节代谢, 抑制愈伤组织细胞的分裂, 加

速胚的发育,使体细胞胚胎早熟并抑制成熟胚的萌发(高述民,2001)。

白刺花下胚轴经过胚性愈伤组织诱导,在 MS+ 2, 4-D $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAA $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +6-BA $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +TDZ $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +蔗糖 4%+谷氨酰胺 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ +植物凝胶 0.3%的培养基上诱导体细胞发生,可使体细胞胚发生率为 66.21%;蔗糖浓度会影响体细胞胚的成熟和增加畸形胚的比例。2%麦芽糖+2%山梨醇+4%蔗糖培养时,体细胞胚成熟率高达 88.89%, $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ PEG 可使体细胞胚成熟率达 82.35%,鱼雷期体细胞胚转接最合适,幼苗炼苗后,移栽成活率达 92%。研究结果可为实现白刺花体细胞胚育苗奠定理论基础和提供可行的方案。

参考文献

- GUPTA PK, PULLMAN GS, 1991. Method for reproducing coniferous plants by somatic embryogenesis using abscisic acid and somatic potential variation[J]. US Patent, 5(1): 36-43.
- HU SP, LIU XM. 2014. Plant cell and tissue culture technology. Beijing: China Agricultural University Press: 339. [胡颂平, 刘选明. 2014. 植物细胞组织培养技术. 北京: 中国农业大学出版社: 339.]
- CHEN JH. SHI JS. ZHU GQ, 2003. Progress on the mechanism of somatic embryogenesis of plants and research trends[J]. J Nanjing Agric Univ (Nat Sci Ed), 27(1): 75-80. [陈金慧, 施季森, 诸葛强. 2003. 植物体细胞胚胎发生机理的研究进展[J]. 南京农业大学学报(自然科学版), 27(1): 75-80.]
- LI FL, BAO WK, WU N, 2009. Morphological and physiological responses of current *Sophora davidii* seedlings to drought stress[J]. Acta ecologica sinica, 29(10): 5406-5416. [李芳兰, 包维楷, 吴宁. 2009. 白刺花幼苗对不同强度干旱胁迫的形态与生理响应[J]. 生态学报, 29 (10): 5406-5416.]
- HE X. 2007. Spatial variation of population characteristic and natural regeneration of *Sophora viciifolia* in the dry valley of the upper Mingjiang river[D]. Sichuan university. [何晓, 2007. 岷江上游干旱河谷白刺花种群特征及其更新特点的空间差异性研究[D]. 四川大学]
- HE JL, ZHANG L, LIU QL, et al, 2018. Physiological and biochemical response of typical shrubs to drought stress in the Minjiang River dry valley. Acta ecologica sinica, 38(7):2362-2371 [何建利, 张利, 刘千里. 等. 2018. 岷江干旱河谷区典型灌木对干旱胁迫的生理生化响应[J]. 生态学报, 38(7):2362~2371.]
- Mao X J, Wen M, Jiang X L, 2009. Research on water decoction partial pharmacodynamics of *Sophora viciifolia* [J]. J Yunnan Tradit Chin Med Mat Med, 30 (2): 44-46. [毛晓健, 温敏, 蒋孝悝. 2009. 白刺花水煎剂的部分药效学研究[J]. 云南中医中药杂志, 30 (2): 44-46.]
- FAN J, GUI MY, ZHAO T R, et al, 2005. Study on the nutritional components of wild *Sophora davidii* romex pavol. Chin wild plant Resour, 24(1): 23 -25. [樊建, 桂明英, 赵天瑞, 等. 2005. 野生苦刺花食用价值研究[J]. 中国野生植物资源, 24(1): 23 -25.]
- WU LF, LU WD, WEI XM, et al, 2014. Effect of different treatment methods on hard seed germination characteristics for *Sophora davidii* [J]. Mod Anim Husb, 2 (6): 47-49. [吴丽芳, 陆伟东, 魏晓梅, 等. 2014. 不同处理方法对白刺花硬实种子萌发特性的影响研究[J]. 当代畜牧, 2 (6): 47-49.]
- WU LF, WEI XM, LU WD, et al, 2018. Dormancy mechanism and breaking methods for hard seeds of *Sophora davidii* [J]. J Southern Agric, 49 (5): 944-949. [吴丽芳, 魏晓梅, 陆伟东, 张越. 2018. 白刺花硬实种子的休眠机制及休眠解除[J]. 南方农业学报, 49 (5): 944-949.]
- XU JX, WU XQ, YE JR, et al, 2017. Development, maturation and germination of somatic embryo of nematode-resistant *Pinus densiflora* [J]. Sci Silv Sin, 53 (12): 41-49. [许建秀,

- 吴小芹, 叶建仁, 等. 2017. 抗松材线虫病赤松体细胞胚的发育和成熟萌发[J]. 林业科学, 53 (12): 41-49.]
- QI LW, HAN YF, HAN SY, et al, 2004. Effects of maltose, NAA and ABA on somatic maturation and radicle rooting of *Larix principis-rupprechtii*[J]. Sci Silv Sin, 40(1): 52-57. [齐力旺, 韩一凡, 等. 2004. 麦芽糖、NAA 及 ABA 对华北落叶松体细胞胚成熟及生根的影响[J]. 林业科学, 40 (1): 52-57.]
- GU XC, XU ZW, CHENG J, et al, 2018. Effects of phytigel and sucrose on regeneration efficiency of somatic embryos and growth of regenerated plants in *Hevea brasiliensis*[J]. Guihaia, 38(9): 1164-1171. [顾晓川, 徐正伟, 成镜. 等. 2018. 植物凝胶和蔗糖对橡胶树体胚植株再生的影响[J]. 广西植物, 38(9):1164-1171.]
- Sun Guijun. 2009. Maturation and germination promotion for somatic embryos of *Fraxinus mandshurica*[D]. Harbin: Northeast forestry university. [孙桂君. 2009. 水曲柳体细胞胚成熟及萌发的促进研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学.]
- GAO SM. 2001. Effects of ABA and PEG on the embryogenesis and regulation of carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryos[J]. J NW Scitechnol Univ Agric For (Nat Sci Ed) 29(2): 3-6. [高述民. 2001. ABA 和 PEG 对胡萝卜体细胞胚诱导和调控的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 29(2): 3-6.]